ヒト IgG 交差反応性 53 kDa・SS-B/La 結合体の吸収と 吸収抗原を用いた ELISA 法による抗 SS-B/La 抗体イムノグロブリンクラスの検討

田 村 裕 昭・高 崎 芳 成
橋 本 博 史・廣 瀬 俊 一

Jpn. J. Clin. Immun., 14 (1) : 17~24, 1991.

Assay for anti-SS-B/La antibody by ELISA using SS-B/La antigen after absorption of complex of SS-B/La and 53kDa which is reactive with anti-human IgG

Hiroaki Tamura, Yoshinari Takasaki, Hiroshi Hashimoto and Shunichi Hirose

Department of Medicine, Division of Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

【Summary】

Using 25~75% ammonium sulfate fraction of rabbit thymus extracts(RTE) SS-B/La antigen was purified by anti-SS-B/La affinity column. The antigen contained 53kDa which was reactive with anti-human IgG, as well as 50, 45 and 43kDa reactive with biotinylated anti-SS-B/La. Moreover, 53kDa polypeptide could be completely absorbed from the antigen by anti-human IgG affinity column. Bound fraction of this column had not only 53kDa but also 50, 45 and 43kDa SS-B/La. It suggested that SS-B/La proteins appeared to be separated into two groups from the point of view whether they were complexed with 53kDa reactive with anti-human IgG or not.

Using the antigen after absorbed by anti-human IgG affinity column, ELISA was developed and immunoglobulin classes of anti-SS-B/La were studied. By this method, anti-SS-B/La were positive Sjögren's syndrome (65.4%), SLE (43.4%), RA (12.8%), PM-DM (4.76%) and PSS (35.7%). All classes of antibodies were observed in patients' sera with Sjögren's syndrome more frequently than the others. A different preference for classes of anti-SS-B/La was found in each rheumatic diseases. In SLE with sicca, IgG class of the antibody was detected more frequently than without sicca, and in RA with sicca, IgM class was dominant. All classes used to be detected simultaneously in sicca alone group.

Key words : SS-B/La,
53 kDa,
human IgG,
ELISA,
immunoglobulin classes

【概 要】

家兎胸腺リン酸緩衝液抽出物を抗原源とし、抗 SS-B/La 抗体アフィニティークロマトグラフィーで精製した SS-B/La 抗原の特性を免疫プロット法で検討したところ、ヒト IgG と交差反応性を有する分子量 53 kDa ポリペプチドと結合している SS-B/La 抗原の存在が示唆された。一方、この 53 kDa ポリペプチドと結合していない SS-B/La 抗原も存在し、この両者は抗ヒト IgG アフィニティークラムで分離可能であった。

53 kDa と結合していない SS-B/La 抗原を用いて確立した抗 SS-B/La 抗体アッセイ系 (ELISA 法) で抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラスについて検討したところ、いずれのクラスの抗体も Sjögren 症候群 (sicca alone および乾燥病態を伴ったリウマチ性疾患) で高率に検出された。また疾患別に検討した結果では、乾燥病態の有無と抗体クラスの関係には疾患により相違が認められた。

I. はじめに

1974 年に Mattioli らが抗 La 抗体¹⁾を、1975 年に Alspaugh らが抗 SS-B 抗体²⁾をそれぞれ全身性エリテマトーデス (以下 SLE)、Sjögren 症候群に特異的な抗体として報告した。後に同一の抗体であることが明らかにされたこの抗体は、乾燥症候群と強い相関を認めるが、その他各種膠原病にも出現することが明らかにされている³⁾。

また近年、抗 SS-B/La 抗体はその対応抗原がさまざまな RNA ポリメラーゼ III の転写産物と結合していることから注目を集めている^{4,5)}。

今回、われわれは家兎胸腺リン酸緩衝液抽出物を抗原源として用い、抗 SS-B/La 抗体アフィニティークロマトグラフィーで精製した SS-B/La 抗原には、ヒト IgG と交差反応性を有する分子量 53 kDa のポリペプチドと結合しているものとしていないものが存在し、この両者が分離可能であることを見いだした。

さらに 53 kDa ポリペプチドと結合していない精製 SS-B/La 抗原を用いた ELISA 法による抗 SS-B/La 抗体アッセイ系を確立し、この方法を用いて各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラスについて検討し、その臨床的意義について考察した。

II. 方 法

1. 血 清

各種自己抗体陽性血清は、順天堂医院を受診した膠原病患者より得た。抗 SS-B/La 抗体の特異性は、二重免疫拡散法⁶⁾で E.M. Tan 博士より供与された標準血清と同一の沈降線を示すことにより確認した。さらに、この血清中にリウマトイド因子活性が存在しないことをラテックス凝集法⁷⁾および ELISA 法⁸⁾で確認した。

なお、抗 SS-A/Ro, Sm, U1-RNP, Scl-70, Ki, PCNA 抗体単独陽性血清の特異性についても、E.M. Tan 博士より供与された標準血清を用い、二重免疫拡散法で確認した。

2. 抗 原 源

SS-B/La 抗原の抗原源として、家兎胸腺の PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer) 抽出液 (RTE) を作製した。家兎胸腺アセトン沫 (Pel-Freez 社) を PBS に溶解し (90 mg/ml), 4°C overnight で攪拌したのち、4,000 g で 30 分間遠沈し、その上清を抗原源とした。

3. 硫 安 塩 析

RTE に 4°C 飽和硫安 (pH 7.0) を加え 25% に調

整後、4,000 g で 30 分間遠沈し、その上清に飽和硫酸をさらに加え 75% に調整した。同様に遠沈して得られた沈澱物をごく少量の PBS に再溶解し、PBS 内で透析した。

4. 抗 SS-B/La 抗体アフィニティークロマトグラフィー

抗 SS-B/La 抗体単独陽性血清より、33% 硫酸塩析、DEAE 52 (Whatman 社) イオン交換クロマトグラフィーにて IgG を分離し、20 mg の IgG を 0.05 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 10 ml に溶解し、CN-Br activated Sepharose 4B (Pharmacia 社) に overnight で coupling した。1M Tris-HCl, pH 8.0 にて blocking したのち、1M NaCl, 0.1 M acetate buffer, pH 4.0 および 1M NaCl, 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 で洗浄し、PBS で平衡化した。

このアフィニティークラムに、RTE の 25~75% 硫酸分画を反応させたのち、1M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 で洗浄し、3M NaSCN で SS-B/La 抗原を回収し、PBS にて透析した。さらに、前述の方法で作製したヤギ抗ヒト IgG (γ 鎖特異的) 抗体 (KPL 社) アフィニティークラムにて、精製抗原中の抗ヒト IgG 反応性物質を吸収した。

5. SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

精製抗原の SDS-PAGE は、Laemmli らの方法⁹⁾に準じ、10% アクリルアミドゲル平板を用いて 2-ME 還元下で施行し、Coomassie Blue で染色した。

6. 免疫ブロット法

Towbin らの方法¹⁰⁾に準じて、各抗原を SDS-PAGE で構成ポリペプチドに展開し、Trans-Blot Cell (Bio-Rad 社) を用いてニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜を 3% ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液で blocking したのちに、至適濃度に希釈した各種標準血清、ペルオキシダーゼ (POX) 標識ヤギ抗ヒト IgG (H 鎖・L 鎖特異性) (KPL 社) 抗体および後述する方法でビオチン化した抗 SS-A/Ro, SS-B/La 抗体との反応性を検討した。なお、検出に際しては 2×10^3 倍に希釈した POX 標識ストレプトアビジン (BRL 社) と反応させたのち、

発色基質として 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (Sigma 社) を用いた。

7. 抗 SS-A/Ro および抗 SS-B/La 抗体のビオチン化

抗 SS-A/Ro および抗 SS-B/La 抗体単独陽性血清より前述の方法で分離した IgG を 0.1 M NaHCO₃, pH 8.2 にて透析し、1.0 mg/ml の IgG 1.0 ml に対し DMSO で溶解した biotin-succinimide (1.0 mg/ml) を 60 μ l 加え、室温で 4 時間反応させたのちに PBS で透析した。

8. 精製 SS-B/La 抗原を用いた ELISA 法

0.05 M carbonate bicarbonate buffer, pH 8.5 にて至適濃度になるように希釈した精製 SS-B/La 抗原を 50 μ l/well ずつ Immunoplate II (Nunk 社) に 4°C, overnight で感作、抗原溶液を取り除いたのちに 1% BSA 溶液 (1% BSA, 0.1% Tween 20/PBS) を加え、4°C, overnight で blocking した。次に、0.1% Tween 20/PBS で 3 回洗浄後、0.1% Tween 20/PBS にて $10^2 \sim 10^7$ 倍まで希釈した抗 SS-B/La 抗体単独陽性標準血清および正常人血清 100 μ l を各 well に加え、室温で 2 時間反応させた。その後、0.1% Tween 20/PBS で 6 回洗浄し、 10^3 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG ヤギ抗体 (KPL 社) を 100 μ l/well 加え、室温にて 2 時間反応させた。洗浄後、*p*-nitrophenyl phosphate 基質溶液を 100 μ l 加え、30 分間反応させたのちの 4 N NaOH を加え反応を停止させ、OD 405 nm を測定した。

同様に、IgM および IgA クラスの抗体の測定に際しても、段階希釈した抗 SS-B/La 抗体陽性標準血清および正常人血清を反応させたのちに、 10^3 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgM および IgA 抗体 (KPL 社) を用いて検出した結果を基に反応曲線を作製した。

III. 対 象

対象とした症例は、ARA 診断基準¹¹⁾を満たす SLE 83 例、ARA 診断基準¹²⁾を definite 以上で満たす慢性関節リウマチ (以下 RA) 39 例、ARA 診断基準¹³⁾を満たす全身性強皮症 (以下 PSS) 28 例、Bohan の診断基準¹⁴⁾を満たす多発性筋炎・皮膚筋炎 (以下 PM-DM) 21 例、正常人 14 例のほか、厚生省

図 1 抗SS-B/La抗体アフィニティークロマトグラフィーで精製した抗原を用いた10% SDS-PAGE
Lane 1; 分子量マーカー
Lane 2; 精製抗原

診断の手引き¹⁵⁾を満たす Sjögren 症候群 (以下 SjS) を合併した SLE 20 例, RA 16 例, PSS 6 例, PM-DM 2 例および sicca alone 34 例である。

IV. 結 果

1. SS-B/La 抗原の精製

① 抗 SS-B/La 抗体アフィニティークロマトグラフィーを用い, RTE の 25~75% 硫酸分画より精製した SS-B/La 抗原の構成ポリペプチドを 10% SDS-PAGE で検討した結果 (図 1, Lane 2), 50, 45, 43 kDa および比較的弱い 53 kDa バンドが認められた。

② 精製抗原の構成ポリペプチドの immuno-reactivity を免疫ブロット法で検討したところ (図 2), ビオチン化抗 SS-B/La 抗体は 50, 45, 43 kDa と特異的に反応したが (Lane 3), 1 次抗体として抗 SS-B/La 抗体単独陽性標準血清を反応させ, POX 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体で検出すると, それらに加え 53 kDa のバンドが検出された (Lane 2)。また, 53 kDa バンドは POX 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体のみを反応させても検出された (Lane 1)。

③ 精製抗原に含まれる 53 kDa ポリペプチドが抗ヒト IgG 抗体と反応することから, 抗 SS-B/La 抗体に特異的な ELISA システム確立のため, このポリペ

図 2 ウェスタンブロット法による精製 SS-B/La 抗原構成ポリペプチドの反応性の検討
各 Lane はそれぞれ以下の抗体と反応させた。

Lane 1; peroxidase 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体, Lane 2; 抗 SS-B/La 抗体陽性標準血清 + peroxidase 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体, Lane 3; ビオチン化抗 SS-B/La 抗体, Lane 4; ビオチン化抗 SS-A/Ro 抗体, Lane 5; peroxidase 標識ヤギ抗ヒト IgM 抗体, Lane 6; peroxidase 標識ヤギ抗ヒト IgA 抗体

プチドを吸収する必要が生じた。そこで, 抗ヒト IgG 抗体アフィニティークラムに前述の精製抗原を反応させたところ, 図 3 に示すように, このカラムを通過した抗原には抗ヒト IgG 抗体と反応する 53 kDa ポリペプチドは検出されず (Lane 4), 50, 45, 43 kDa のみが検出された (Lane 3)。一方, カラムに吸着した蛋白成分には 53 kDa ポリペプチド (Lane 2) に加え, 50, 45, 43 kDa から成る SS-B/La 抗原が検出された (Lane 1)。このことから, SS-B/La 抗原にはヒト IgG と交差反応性を有する 53 kDa と結合しているものとしていないものがあり, 両者は分離可能であることが示唆された。

以下 ELISA 法の確立に際しては, 53 kDa ポリペプチドと結合していない SS-B/La 抗原を用いた。

図 3 抗ヒト IgG 抗体アフィニティーカラムによるヒト IgG 交差反応性ポリペプチドの吸収 (ウェスタンブロット法)
Lane 1,2 はカラムからの溶出抗原, Lane 3,4 はカラムを通過した抗原をおのおの展開したのち, Lane 1,3 にはビオチン化抗 SS-B/La 抗体, Lane 2,4 には peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体を反応させた。

2. 精製 SS-B/La 抗原を用いた ELISA 法の確立
53 kDa ポリペプチドと結合していない SS-B/La 抗原を感作させたイムノプレートを用いて, 抗 SS-B/La 抗体単独陽性標準血清との反応曲線を作り, 至適感作濃度は $5.0 \mu\text{g/ml}$, 血清の希釈倍率は IgG・IgM クラス測定時 2×10^3 倍, IgA クラス測定時 10^3 倍とした。なお, このアッセイ系は対照とした正常人血清および抗 SS-A/Ro, Sm, U1-RNP, Scl-70, Ki, PCNA 抗体陽性標準血清とは反応せず, 抗 SS-B/La 抗体への特異性が確認された。なお, 正常人血清の平均値+3 SD を cut-off 値として抗 SS-B/La 抗体の有無を判定した。

3. ELISA 法による各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体の検出率およびイムノグロブリンクラスの検討

表 1 に示すように, 全イムノグロブリンクラスでみた抗 SS-B/La 抗体の出現率は Sjögren 症候群

表 1 ELISA法による各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体の出現率(全イムノグロブリンクラス)

疾患名	(患者数)	出現率 (%)
Sjögren 症候群	(78)	65.4 *
SLE	(83)	43.2
RA	(39)	12.8
PM-DM	(21)	4.76
PSS	(28)	35.7

(* $p < 0.01$)

表 2 ELISA法による各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラス別出現率

疾患名	(患者数)	クラス別出現率 (%)		
		IgG	IgA	IgM
Sjögren 症候群 (78)	55.1*	20.5	24.4	
SLE (83)	31.3	12.0	13.3	
RA (39)	12.8	5.26	7.69	
PM-DM (21)	4.76	0.00	4.76	
PSS (28)	14.3	3.57	25.0	

(* $p < 0.01$)

SLE=Systemic Lupus Erythematosus

RA=Rheumatoid Arthritis

PM-DM=Polymyositis-Dermatomyositis

PSS=Progressive Systemic Sclerosis

(sicca alone あるいは乾燥病態を伴ったリウマチ性疾患) に有意に高率であった。乾燥病態を伴わないリウマチ性疾患の中では SLE の 43.4%, PSS の 35.7% に同抗体が検出され, これは RA, PM-DM に比較し高率であった。

次に, 各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラス別検出率を検討したところ, SjS で IgG クラスの抗体が有意に高率に検出された。また, IgA クラスの抗体検出率は SjS において高い傾向を示した (表 2)。

次に, 抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラス別検出率と乾燥病態の有無について各疾患別に検討したところ (表 3), SLE では IgG, RA では IgM クラスの抗体の出現率が乾燥病態を伴う群で有意に高く, 疾患により乾燥病態の合併と関連したイムノグロブリンクラスに相違がある可能性が示唆された。また sicca alone と SLE では IgA クラスの抗体検出率が高い傾向が認められた。

次に, 抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラス構成を sicca 単独, 乾燥病態を伴ったリウマチ性疾患, 乾燥病態を伴わないリウマチ性疾患の 3 群で比較

検討した (表 4)。いずれの群でも IgG 単独の場合が最も多かったが、2~3 種類のクラスの抗体が共存することもあった。とくに sicca alone 群では他群に比して IgG, A, M が同時に検出される傾向が高く、IgM の検出率が低かった (表 4)。

V. 考 按

精製 SS-B/La 抗原の分子量については諸家によりさまざまな報告がなされているが、Chan らが RTE (60~80% 硫酸分画) を抗原源として westernblot 法で検討した結果¹⁶⁾によると、native な 45~50 kDa ポリペプチドおよび 40~43 kDa の degradate が抗原性をもっていると考えられている。われわれが RTE (25~75% 硫酸分画) を抗原源として精製した SS-B/La 抗原の抗原性は、その分子量の点で彼らの報告と一致した。しかし、ヒト IgG と交差反応性を有する 53 kDa ポリペプチドを含んでいる点が同一ではなかつた。

表 3 各種リウマチ性疾患における抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラス別検出率と乾燥病態の関係

疾 患 名	(患者数)	クラス別検出率 (%)		
		IgG	IgA	IgM
Sicca 単独	(34)	58.8	23.5	17.6
SLE 単独	(83)	31.3	12.0	13.3
SLE+sicca	(20)	70.0*	35.0	30.0
RA 単独	(39)	12.8	5.26	7.69
RA+sicca	(16)	37.5	6.25	37.5*
PM-DM 単独	(21)	4.76	0.00	4.76
PM-DM+sicca	(2)	0.00	0.00	0.00
PSS 単独	(28)	14.3	3.57	25.0
PSS+sicca	(6)	50.0	0.00	16.7

(*p<0.01)

この 53 kDa ポリペプチドは、抗ヒト IgA および IgM 抗体とは反応せず、また抗ウサギ IgG、マウス IgG、ヤギ IgG 抗体との反応も認められず、抗ヒト IgG 抗体との反応性が特異的であることが確認された (データは示していない)。

われわれがアフィニティークロマトグラフィー作製に用いた抗 SS-B/La 抗体単独陽性標準血清中にはリウマトイド因子が共存しないことは、ELISA 法およびラテックス凝集法にて確認しており、混在したリウマトイド因子活性との反応により 53 kDa ポリペプチドが精製されてきたとは考えられなかった。また、抗ヒト IgG アフィニティークラムを用いて、このヒト IgG と交差反応性を有する 53 kDa ポリペプチドを吸収した際に、カラムからは 53 kDa のみならず、同時に SS-B/La 抗原が溶出された。なお、今回データを示してはいないが、RTE を抗原源とし、ヤギ抗ヒト IgG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより直接 53 kDa および SS-B/La 抗原が精製可能であったことから、抗 SS-B/La 抗体アフィニティークラムに用いたヒト IgG が SS-B/La 抗原と結合してカラムから脱落してきたとは考えられない。以上のことから、SS-B/La 抗原にはヒト IgG と交差反応性を有する 53 kDa と結合しているものとしていないものが存在し、この両者は分離可能であることが示唆された。

この 53 kDa と SS-B/La 抗原の結合体は RTE の 25~60% 硫酸分画に存在するが、60~80% 分画には検出されなかった (データは示していない)。従来の報告の大部分が 60~80% 分画を抗原源としているためわれわれが見いだした 53 kDa と結合している SS-B/La 抗原に言及しなかった可能性が考えられる。

われわれの精製抗原中に存在する 53 kDa は、その抗原性の点において SS-A/Ro 抗原とは異なるもので

表 4 抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラスの組合せと乾燥病態の関係

イムノグロブリンクラスの 組合せ	疾 患 名 (患者数)		
	sicca 単独 (21)	sicca+CTD (30)	CTD 単独 (52)
M	0.00	20.0	23.1
G	57.1	36.7	42.3
A	4.76	3.33	7.69
M+G+A	23.8	10.0	9.62
M+G	4.76	16.7	11.5
M+A	0.00	0.00	0.00
A+G	9.52	13.3	5.77

CTD=Connective Tissue Disease

(単位: %)

あるが、SS-A/Ro 抗原と IgG のエпитープに共通性があるとする報告¹⁷⁾や SS-A/Ro 抗原と SS-B/La 抗原の分子相互の関係について言及している報告¹⁸⁾がある。従来、RTE 中に SS-A/Ro 抗原は存在しないとされてきた¹⁹⁾が、最近 52 kDa の SS-A/Ro 抗原の存在も報告されており²⁰⁾、53 kDa がそれと関連した分子である可能性もあり、今後さらに検討すべき課題であると考えられた。

ELISA 法による SS-B/La 抗体測定系を確立するに際して、われわれはヒト IgG と交差反応性を有する 53 kDa ポリペプチドと結合している SS-B/La 抗原を吸収したのちの、いわばフリーの状態で存在する精製 SS-B/La 抗原を用いた。これにより、background reactivity のないきわめて特異性の高いアッセイ系を確立した。

従来、二重免疫拡散法による検討で抗 SS-B/La 抗体は抗 SS-A/Ro 抗体に比較し SjS に対する特異性が高く、とりわけ SjS の中でも primary sicca complex と SLE を伴う SjS に高頻度に認められ、SjS を伴わない SLE や RA, PSS, PM, MCTD 症例ではほとんど検出されない²¹⁾とされてきた。しかし、ELISA 法を用いた Maddison らの検討では²²⁾、SLE (24%)、RA (22%)、PSS (37%)、PM (18%) で抗 SS-B/La 抗体が検出された。今回のわれわれの検討でも Sjögren 症候群 (65.4%)、SLE (43.2%)、PSS

(35.7%) でかなり高率に抗 SS-B/La 抗体が検出され、従来の検出法では検出されない同抗体が高感度の ELISA 法を用いたことで検出可能となったものと考えられた。

さらに、同抗体の出現率をイムノグロブリンクラス別に検討したところ、PSS では IgM クラスの抗体が高頻度に検出されたが、抗 Sm 抗体のイムノグロブリンクラスの検討²³⁾でも、IgM クラスの抗体は SLE 以外のリウマチ性疾患にも検出されたとされ、今回高頻度に認められた IgM 抗 SS-B/La 抗体が PSS の診断に有意義なものかどうかはさらに検討を重ねなければならないと考えられた。

また、IgA クラスの抗 SS-B/La 抗体は乾燥病態を伴わない疾患群では検出率が低く、sicca 単独群および乾燥病態を伴う SLE に検出率が高かった。さらに、SLE では IgG、RA では IgM クラスの抗体が乾燥病態を伴う群に有意に高率に検出された。以上のように、抗 SS-B/La 抗体のイムノグロブリンクラスの検討は臨床的に有意義であると考えられた。

イムノグロブリンクラスの組合せに関する検討では、sicca の有無にかかわらず IgG 単独の場合が多かったが、sicca 単独群では IgG、IgA、IgM が同時に検出される傾向が強く、抗体発現のメカニズムの面からも今後さらに検討を重ねる必要があると考えられた。

文 献

- 1) Mattioli, M., Reichlin, M. : Heterogeneity of RNA protein antigen reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 17 : 421~429.
- 2) Alsbaugh, M.A., Tan, E.M. : Antibodies to cellular antigen in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 55 : 1067~1073, 1976.
- 3) Tan, E.M. : Autoantibodies to nuclear antigens (ANA) : their immunology and medicine. *Adv. Immunol.*, 33 : 167~240, 1982.
- 4) Reddy, R., Henning, D. et al. : Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase transcripts [4.5I RNA]. *J. Biol. Chem.*, 258 : 8352~8356, 1983.
- 5) Lerner, M.R., Andrews, N.C. et al. : Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 805~809, 1981.
- 6) Venables, P.J.W., Charles, P.J., et al. : Quantitation and detection of isotypes of anti-SS-B antibodies by ELISA and Farr assays using affinity purified antigens. *Arthritis Rheum.*, 26 : 146~155, 1983.
- 7) Singer, J.M., Plotz, C.M. : The latex fixation test, Application to the serological diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, 21 : 888~892, 1956.
- 8) Teitsson, I., Vardimarsson, H. : Use of monoclonal antibodies and F (ab') enzyme conjugated in ELISA for IgM, IgA and IgG

- rheumatoid factors. *J. Immuno. Methods*, 71 : 149~161, 1984.
- 9) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227 : 680~685, 1970.
 - 10) Towbin, H., Staehelin, T. et al. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350~4354, 1979.
 - 11) Tan, E.M., Cohen, A.S. et al. : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 25 : 1271~1277, 1982.
 - 12) Ropes, M.W., Bennet, G.A. et al. : 1958 revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull. Rheum. Dis.*, 9 : 175~176, 1958.
 - 13) Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee : Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.*, 23 : 581~590, 1981.
 - 14) Bohan, A., Peter, J.B. : Polymyositis and dermatomyositis (First of Two Parts). *N. Engl. J. Med.*, 292(7) : 344~347, 1975.
 - 15) 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班 : 昭和52年度研究業績集, 1978, p. 6.
 - 16) Chan, E.K.L., Francoeur, A.M., Tan, E.M. : Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J. Immunol.*, 136 : 3744~3749, 1986.
 - 17) Mamula, M.J., Fox, O.F., Yamagata, H. et al. : The Ro/SSA autoantigen as an immunogen some anti-Ro/SSA antibody binds IgG. *J. Exp. Med.*, 12 : 1889~1901, 1986.
 - 18) Hardin, J.A. : The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 29 : 457~460, 1986.
 - 19) Harmon, C.E., Jau-Shyong Deng, Peebles, C. L. et al. : The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.*, 27 : 166~173, 1984.
 - 20) Ben-Chetrit, E. : A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.*, 167 : 1560~1571, 1988.
 - 21) Akizuki, M., Truitt, M.J.B., Kasson, A.D. et al. : Purification of an acid nuclear protein antigen and demonstration of its antibodies in subsets of patients with sicca syndrome. *J. Immunol.*, 119 : 932~938, 1977.
 - 22) Maddison, P.J. : Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SSA) and La (SSB) detected by ELISA : their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin. Exp. Immunol.*, 62 : 337~345, 1985.
 - 23) Yasuma, M., Takasaki, Y., Matsumoto, K. et al. : Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 17 : 469~475, 1990.
-